

09/508251

PCT/JP98/04118

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

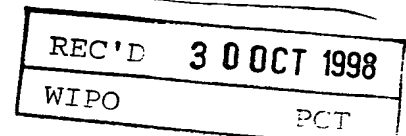
11.09.98

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application:

1997年 9月11日



出 願 番 号  
Application Number:

平成 9年特許願第264853号

出 願 人  
Applicant (s):

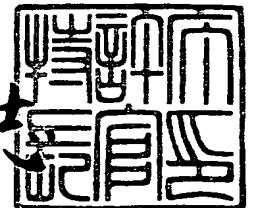
中外製薬株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1998年10月16日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平10-3082239

【書類名】 特許願

【整理番号】 P97XX-058

【提出日】 平成 9年 9月11日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C07K 16/18  
C12N 5/10  
C12P 21/08

【発明の名称】 アポトーシスを誘起するモノクローナル抗体

【請求項の数】 6

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内

【氏名】 福島 直

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内

【氏名】 宇野 慎介

【特許出願人】

【識別番号】 000003311

【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100088155

【弁理士】

【氏名又は名称】 長谷川 芳樹

【選任した代理人】

【識別番号】 100089978

【弁理士】

【氏名又は名称】 塩田 辰也

【選任した代理人】

【識別番号】 100092657

【弁理士】

【氏名又は名称】 寺崎 史朗

【選任した代理人】

【識別番号】 100094318

【弁理士】

【氏名又は名称】 山田 行一

【選任した代理人】

【識別番号】 100089901

【弁理士】

【氏名又は名称】 吉井 一男

【選任した代理人】

【識別番号】 100107191

【弁理士】

【氏名又は名称】 長濱 範明

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 014708

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 受託番号を証明する書面 2

【書類名】 明細書

【発明の名称】 アポトーシスを誘起するモノクローナル抗体

【特許請求の範囲】

【請求項1】 Integrin Associated Protein (IAP) を有する有核血液細胞にアポトーシス (apoptosis) を誘起するモノクローナル抗体。

【請求項2】 Integrin Associated Protein (IAP) を有する有核血液細胞にアポトーシス (apoptosis) を誘起するモノクローナル抗体断片、ペプチド、および低分子化合物。

【請求項3】 請求項1記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項4】 IAPに結合してIAPの作用を亢進させ、有核血液細胞にアポトーシスを誘起する物質を含有する抗白血病治療剤。

【請求項5】 請求項4の物質がモノクローナル抗体であることを特徴とする抗白血病治療剤。

【請求項6】 請求項4の物質がモノクローナル抗体断片、ペプチド、低分子化合物であることを特徴とする抗白血病治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、 Integrin Associated Protein (IAP) を有する有核血液細胞にアポトーシスを誘起する特性を有する新規モノクローナル抗体、ならびにその断片、ペプチドおよび低分子化合物、および当該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマに関する。当該新規抗体は、骨髄性白血病およびリンパ性白血病の治療薬等として有用である。

【0002】

【従来技術】

従来、顆粒球コロニー刺激因子、例えば、遺伝子組換え型顆粒球コロニー刺激因子 (rG-CSF) は、主に顆粒球系細胞の分化、増殖を促進させる液性因子

として知られている。また、マウスの *in vivo* の実験に基づき、当該 *rG-CSF* を投与することにより、骨髓の造血亢進のみならず、脾臓でも著しい髄外造血が起こり造血幹細胞を始めとしてすべての造血前駆細胞が脾臓で増殖することが報告されている。係る脾臓での髄外造血のメカニズムとして、*rG-CSF* の刺激により脾臓の造血微小環境が変化し、造血支持能力が亢進したことにより造血が生じたものであると考えられた。

【0003】

そこで、本発明者は、当該脾臓での造血機能を解明するため、*rG-CSF* 連投後の脾臓の間質細胞に着目し、間質細胞を介した *rG-CSF* による造血機能亢進の解析を試みるべく、*rG-CSF* を連投したマウス脾臓より造血間質細胞株（CF-1細胞）を樹立し、係る造血間質細胞を用いてその造血支持能を検討したところ、*in vitro* でのコロニー刺激活性および *in vivo* での造血幹細胞支持能を認めた〔Blood, 80, 1914 (1992)〕。

【0004】

しかし、当該脾臓間質細胞については、その一部が細胞株（CF-1細胞）として樹立され、その細胞学的特性の検討等はなされているが、当該細胞表面抗原を認識する特定の抗体を作製することは全く行われておらず、ましてやその特性等については未だ全く知られていなかった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

そこで、本発明者は、脾臓間質細胞に関する前記知見と、従来の研究結果を踏まえ、脾臓間質細胞を識別し得る特定の抗体を開発することを目標として鋭意研究し、当該脾臓間質細胞株を感作抗原とするモノクローナル抗体の作製を試み、新規モノクローナル抗体を取得することに成功した。

【0006】

さらに、前記取得されたモノクローナル抗体の特性について検討し、当該モノクローナル抗体は、骨髓系細胞にアポトーシスを誘起する特性を有するものであることを見い出した。以下、当該モノクローナル抗体をBMAP-1抗体と命名し、使用する。

【0007】

さらに、前記BMAP-1抗体が認識する抗原について検討し、直接発現クローニング(Direct Expression Cloning)により、マウスIntegrin Associated Protein(マウスIAP)(Genbank、Accession Number Z25524)であることを見出した。

【0008】

さらに、前記BMAP-1抗体の作用を、マウスIAPを遺伝子導入した組み換え体細胞を用いて検討した。すなわち、マウスIAPを発現していないJurkat細胞に、常法によりマウスIAP遺伝子を導入し、マウスIAPを発現する細胞株(Recombinant Jurkat Cell)を作製し、BMAP-1抗体の当該マウスIAP発現細胞に対する作用をMTS法およびフローサイトメトリーによるDNA断片化の検索により検討した(特願平9-67499)。

【0009】

以上の知見に基づき、ヒトのIntegrin Associated Protein(以下ヒトIAPとする; J. Cell. Biol., 123, 485-496, 1993にアミノ酸配列および塩基配列は記載; Journal of Cell Science, 108, 3419-3425, 1995)を抗原とするモノクローナル抗体は、当該抗原を発現する有核血液細胞(骨髄系細胞およびリンパ球)にアポトーシスを誘起する効果があるとの予想に基づき、本発明者は、ヒトIntegrin Associated Proteinを抗原としてモノクローナル抗体の作製を試み、当該抗原を有するヒト有核血液細胞にアポトーシスを誘起するモノクローナル抗体を得ることに成功した。

【0010】

すなわち、本発明は、ヒトのIntegrin Associated Protein(ヒトIAP)を有する有核血液細胞(骨髄系細胞およびリンパ球)にアポトーシスを誘起させる特性を有する新規モノクローナル抗体およびその断片、更には、当該モノクローナル抗体を産生させるハイブリドーマを提供す

ることを目的とするものである。

【0011】

係る新規モノクローナル抗体は、骨髄性白血病およびリンパ性白血病の治療薬等として有用である。

【0012】

さらに、Integrin Associated Protein の機能としては、インテグリンの $\alpha V\beta 3$ の $\beta$ 鎖に結合し $\alpha V\beta 3$ とそのリガンド (Ligand) であるビトロネクチン (Vitronectin) との結合を支持する作用 (J. Cell. Biol., 123, 485-496 (1993))、好中球と血管内皮との接着に際し血管内皮に $Ca^{2+}$ の流入を誘導する作用 (J. Biol. Chem., 268, 19931-19934 (1993))、あるいは好中球が血管内皮を通過することを支持する作用が報告されているが (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 3978-3982 (1995))、有核血液細胞についてのアポトーシスに関する機能は報告されていない。

【0013】

【課題を解決するための手段】

本発明に係るモノクローナル抗体は、ヒト Integrin Associated Protein を特異的に認識する抗体である。従って、ヒト Integrin Associated Protein の識別、及び同定する機能を有するものである。

【0014】

さらに、本発明のモノクローナル抗体は、ヒト Integrin Associated Protein を有する有核血液細胞 (骨髄系細胞およびリンパ球) のアポトーシスを誘起する特性を示す抗体である。ここで、アポトーシス (apoptosis) とは、核クロマチン DNA がヌクレオソーム単位で切断 (いわゆるラダー・フォーメーション) され、その結果、細胞を死に至らしめる現象で、細胞自滅とも云われる現象である。

【0015】

従来、有核血液細胞（骨髓系細胞およびリンパ球）にアポトーシスを誘起する特性を有するモノクローナル抗体として知られているものに、抗Fas抗体（Cell, 66, 233-243, 1991）、抗CD43抗体（Blood, 86, 502-511, 1995）、抗HLA Class I $\alpha$ 1 Domain（Blood, 90, 726-735, 1997）抗体等があるが、本発明に係る、Integrin Associated Proteinを認識する抗体が有核血液細胞にアポトーシスを誘起する特性については全く知られていない。従って、本発明に係るモノクローナル抗体は、Integrin Associated Proteinを特異的に認識可能な抗体であり、また、Integrin Associated Proteinを有する有核血液細胞（骨髓系細胞およびリンパ球）にアポトーシスを誘起する特性を有するすべてのモノクローナル抗体を包括するものとして定義される。

【0016】

さらに 本発明に係る抗体は、すべての有核血液細胞にアポトーシスを誘起するもののみに限定されない。少なくとも一種の有核血液細胞にアポトーシスを誘起するものも含まれる。具体的には、骨髓性白血病ならば少なくとも骨髓系細胞にアポトーシスを誘起すればよい。

【0017】

より詳しくは、本発明は、Integrin Associated Protein (IAP) を有する有核血液細胞にアポトーシス (apoptosis) を誘起するモノクローナル抗体を提供するものである。

【0018】

さらに、本発明は、Integrin Associated Protein (IAP) を有する有核血液細胞にアポトーシス (apoptosis) を誘起するモノクローナル抗体断片、ペプチド、および低分子化合物を提供するものである。

【0019】

また、本発明は、上記のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを提供するものである。



【0020】

さらに、本発明は、IAPに結合してIAPの作用を亢進させ、有核血液細胞にアポトーシスを誘起する物質を含有する抗白血病治療剤を提供するものである。

【0021】

また、本発明は、上記の物質がモノクローナル抗体であることを特徴とする抗白血病治療剤を提供するものである。

【0022】

さらに、本発明は、上記の物質がモノクローナル抗体断片、ペプチド、低分子化合物であることを特徴とする抗白血病治療剤を提供するものである。

【0023】

【発明の実施の形態】

モノクローナル抗体の作製

本発明のモノクローナル抗体は、一般的には次のようにして作製することができる。すなわち、本発明のモノクローナル抗体は、例えば、ヒトIntegrin Associated Proteinを感作抗原とし、当該抗原を通常公知の免疫法を応用して免疫し、通常公知の細胞融合法を応用して細胞融合させ、通常公知のクローン化法を応用してクローン化することにより可能である。

【0024】

本発明のモノクローナル抗体の作製方法には、より具体的には、例えば、前記感作抗原として、ヒトIntegrin Associated Proteinをマウス白血病細胞株L1210細胞に発現させた組み換え体細胞を使用し、当該感作抗原で免疫した哺乳動物の形質細胞（免疫細胞）を、マウス等の哺乳動物のミエローマ細胞と融合させ、得られた融合細胞（ハイブリドーマ）をクローン化し、その中から前記細胞株を認識する本発明の抗体を産生するクローンを選別し、これを培養して目的とする抗体を回収する方法が好適なものとして例示される。

【0025】

なお、本発明においては、上記方法はあくまで一例に過ぎず、例えば、この場

合、前記感作抗原としては、前記L1210組み換え体細胞に限らず、ヒトIntegrin Associated Protein (IAP) そのもの、あるいは可溶化型のヒトIAPを使用することも適宜可能であり、前記L1210組み換え体細胞の場合と同様にして、目的とする有核血液細胞（骨髄系細胞およびリンパ球）にアポトーシスを誘起するモノクローナル抗体を作製することが可能である。

【0026】

また、当該抗体のcDNAライブラリーからファージ・ディスプレイ法を用いて目的とするモノクローナル抗体を作製することも可能である。

【0027】

このようなモノクローナル抗体の作製方法において、前記感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用するミエローマ細胞との適合性などを考慮して選択するのが好ましく、一般的には、マウス、ラット、ハムスター等が好適なものとして使用される。

【0028】

また、免疫は、一般的方法により、例えば、前記ヒトIntegrin Associated Proteinを発現するL1210組み換え体細胞等を哺乳動物に腹腔内注射等により投与することに好ましく実施可能である。より具体的には、PBSや生理食塩水等で適量に希釈、懸濁したものを、動物に10日毎に数回投与することが好ましい。免疫細胞としては、前記細胞株の最終投与後に摘出した脾細胞を使用するのが好ましい。

【0029】

次に、前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としての哺乳動物のミエローマ細胞としては、すでに公知の種々の細胞株、例えば、P3 (P3X63Ag8.653) [J. Immunol., 123, 1548 (1978)]、P3-U1 [Current Topics in Microbiology and Immunology, 81, 1-7 (1978)]、NS-1 [Eur. J. Immunol., 6, 511-519 (1976)]、MPC-11 [Cell, 8, 405-415 (1976)]、Sp2/0-Ag14 [Natu

re, 276, 269-270 (1978)]、FO [J. Immunol. Meth., 35, 1-21 (1980)]、S194 [J. Exp. Med., 148, 313-323 (1978)]、およびR210 [Nature, 277, 131-133 (1979)] 等が好適に使用される。

【0030】

前記免疫細胞とミエローマ細胞との細胞融合は、基本的には通常の方法、例えば、ミルシュタインら (Milstein et al.) の方法 [Methods Enzymol., 73, 3-46 (1981)] 等に準じて行うことができる。

【0031】

より具体的には、前記細胞融合は、例えば、融合促進剤の存在下に通常の栄養培地中で実施される。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG)、センダイウイルス (HVJ) 等が使用され、更に、所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を適宜添加使用することもできる。免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は、例えば、ミエローマ細胞に対して、免疫細胞を1~10倍程度とするのが好ましい。また、前記細胞融合に用いる培地としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI-1640培地、MEM培地、その他、この種の細胞培養に使用される通常の培地が使用可能であり、更に、牛胎児血清 (FBS) 等の血清補液を併用することも可能である。

【0032】

細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培地内でよく混合し、予め37℃程度に加温したPEG溶液、例えば、平均分子量1,000~6,000程度のPEGを、通常、培地に約30~60% (W/V) の濃度で添加し、混合することによって行われる。続いて、適当な培地を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことにより目的とするハイブリドーマが形成される。

【0033】

当該ハイブリドーマは、通常を選択培地、例えば、HAT培地 (ヒポキサンチ

ン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培地)で培養することにより選択される。当該HAT培地による培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞(未融合細胞)が死滅するのに十分な時間、通常、数日～数週間継続する。次いで、通常の限界希釈法に従って、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単一クローン化が実施される。

## 【0034】

このようにして作製される本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培地で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。

## 【0035】

当該ハイブリドーマから本発明のモノクローナル抗体を採取するには、当該ハイブリドーマを常法に従って培養し、その培養上清から得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性のある哺乳動物に投与して増殖させその腹水から得る方法など適宜の方法が採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適した方法であり、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適した方法である。

## 【0036】

更に、前記した方法により得られる抗体は、塩析法、ゲル濾過法、アフィニティークロマトグラフィー等の通常の精製手段を応用して高純度に精製することができる。

## 【0037】

モノクローナル抗体断片

本発明に係るモノクローナル抗体は、上記説明した抗体の全部でもまた、その一部であってもよい。すなわち、本発明に係るモノクローナル抗体の一部であって、さらには、ヒトIntegrin Associated Proteinを特異的に認識するものであり、また、ヒトIntegrin Associated Proteinを有する有核血液細胞(骨髄系細胞およびリンパ球)にアポトーシスを惹起するものであればよい。係る断片は例えば、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'が挙げられる。さらに、係る断片の作製はパパイン、ペプシン、フィシン等の酵素消化により可能である。得られた断片の特性は上記説明し

た同様の方法で確認可能である。

【0038】

モノクローナル抗体と同様の作用を有するペプチドおよび低分子化合物

上記モノクローナル抗体は、ヒト Integrin Associated Protein を認識し、有核血液細胞にアポトーシスを誘起するが、同様に IAP を認識し、有核血液細胞にアポトーシスを誘起するペプチドおよび低分子化合物も包含するものである。

【0039】

本発明のモノクローナル抗体の特性

本発明のモノクローナル抗体は、後記する実施例において具体的に示されるように、ヒト Integrin Associated Protein を特異的に認識するものである。

【0040】

さらに、本発明のモノクローナル抗体はヒト Integrin Associated Protein を有する有核血液細胞（骨髄系細胞およびリンパ球）にアポトーシスを惹起するものである。

【0041】

また、係る特性を利用することにより、骨髄性白血病およびリンパ性白血病の治療等の分野において有用な治療薬剤等として使用し得るものである。

【0042】

すなわち、本発明のモノクローナル抗体を利用して有核血液細胞にアポトーシスを引き起こす抗原等を特異的に認識する抗体として、これらを識別、同定するための、あるいは、当該モノクローナル抗体の固有の特性を利用して骨髄性白血病およびリンパ性白血病治療薬剤等として使用するための具体的システムの構築、その改変および応用等は、当業者にとって自明の通常の方法を応用して実施されるものである限り、いずれも本発明の範囲に含まれるものであることは云うまでもない。

【0043】

抗白血病治療剤

本発明に係る抗白血病治療剤は、IAPの作用が本発明に係る抗体等の結合により亢進することに基づくものである。また、本発明に係る抗体の投与量については特に制限はないが、 $5\mu\text{g}-500\text{mg/kg}$ の範囲であることが好ましい。

【0044】

【実施例】

次に、本発明を実施例に基づいて更に具体的に説明するが、本発明は当該実施例に限定されるものではない。

【0045】

実施例（モノクローナル抗体の作製）

（１）感作抗原と免疫法

感作抗原として、DBAマウス由来の白血病細胞株L1210細胞（ATCC株番号CCL-219, J. Natl. Cancer Inst. 10:179-192, 1949）にヒトIntegrin Associated Protein（IAP）を高発現した細胞株を用いて抗原感作を行った。

【0046】

ヒトIAPの遺伝子は、HL-60細胞株のmRNA（CLONTECH社製）より作製したcDNAを鋳型としてヒトIAP特異的な塩基配列を持つプライマー（センス・プライマーとしては、GCAAGCTTATGTGGCCCCCTGGTAGCGを、アンチセンス・プライマーとしては、GCGGCCGCTCAGTTATTCCTAGGAGGを使用した。）を用いたPCRによりヒトIAPを増幅した（図1）。

【0047】

このPCR産物をクローニングベクターpGEM-T vector（プロメガ社製）に組み込み大腸菌JM109（タカラ社製）にトランスフォーメーションし、Insert DNAの塩基配列をDNAシーケンサー（373A DNA sequencer, ABI社製）にて確認後、発現ベクターpCOS1に組み換えた。

【0048】

発現ベクター pCOS1 は、pEF-BOS (Nucleic Acids Research, 18, 5322, 1990) のデリバティブであり、ヒトエロンゲーション・ファクター-1 $\alpha$  をプロモーター/エンハンサーとして使用し、ネオマイシン耐性遺伝子を組み込んだベクターである。このヒト IAP を組み込んだ発現ベクターを L1210 細胞株に DMRIE-C (GIBCO-BRL 社製) を用いて遺伝子導入し Geneticin (最終濃度 1mg/ml, GIBCO-BRL 社製) により選択し、さらに、遺伝子が導入された L1210 細胞は限界希釈法により細胞をクローニングした。

【0049】

得られたクローンについて、ヒト IAP を認識する抗 CD47 抗体 (ファージン社製) で抗原の発現を検討し、発現量の高いクローンを抗原感作の細胞として選択した (図 2, 3)。この組み換え体 L1210 細胞の培養条件は、10% 牛胎児血清 (FBS, Moredgate 社製)、Iscove 改変 Dulbecco 培地 (IMDM) (GIBCO-BRL 社製) を培地として使用し、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター中で 37℃ の温度条件下で継代培養を行った。

【0050】

免疫動物としては、L1210 細胞と同系マウスである DBA/2 マウス (日本チャールズリバー繁殖) を使用した。抗原感作に使用したヒト Integrin Associated Protein (IAP) を遺伝子導入した L1210 細胞は、マイトマイシン-C (協和発酵社製) 200  $\mu$ g/ml の濃度で約 30 分インキュベーションし細胞の増殖を止めた後、マイトマイシン-C を完全に洗浄し、PBS に懸濁した。

【0051】

この細胞を約  $5 \times 10^6$  個の細胞数で約 10 日前後の間隔で 3 回上記のマウス腹腔内に注射し免疫した。3 回免疫後に眼窩より血液を採取しその血清を 1% BSA 含有 PBS で 50 倍希釈し、この血清希釈液と抗原感作に用いた組み換え体 L1210 細胞との結合性を FACSscan (ベクトン・ディッキンソン社製) により確認し (図 4)、活性の最も高い個体について、4 回目の免疫のさらに 5 日後に約  $1 \times 10^7$  個細胞を腹腔内に投与し追加免疫を行った。最終免疫 4 日後に

マウスを屠殺して脾臓を摘出した。

【0052】

## (2) 細胞融合

上記のマウスから摘出した脾臓を細切後、遊離した脾細胞を遠沈した後、IMDM培地中に懸濁し、浮遊させ、十分に洗浄を行った。一方、マウス・ミエローマ細胞株P3-U1 [Current Topics in Microbiology and Immunology, 81, 1-7 (1978)] を、10%牛胎児血清(FBS、Moregate社製)を含有するIMDM培地にて培養し、同様に前記IMDM培地で洗浄後、その $1 \times 10^7$ 個と、前記脾細胞 $5 \times 10^7$ 個とを遠心管に入れ混合し、ポリエチレングリコール4000(半井化学社製)によって常法[Clin. Exp. Immunol., 42, 458-462 (1980)]に従い細胞融合させた。

【0053】

次いで、得られた融合細胞を、10%FBSおよび融合細胞の増殖刺激剤(BM-Condimed H1, ベーリンガー・マンハイム社製)を含むIMDM培地にて懸濁し96個のウェルプレートに分注し、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中で37℃で培養した。翌日にHAT選択培地および増殖刺激剤を含む10%FBS・IMDM培地に置換して培養を継続し、増殖維持させた。

【0054】

次に、このようにして得られた融合細胞についてその培養上清の機能を白血病細胞株を用いて検討するため、融合細胞の培地を10%FBSを含むIMDM培地に代え、培養を継続し増殖維持させた。

【0055】

## (3) スクリーニング

上記の融合細胞の培養上清を用いて以下のスクリーニングを行った。

【0056】

### ① 一次スクリーニング

ヒトIntegrin Associated Protein (IAP) の遺伝子を遺伝子導入したマウス脾臓間質細胞株(CF-1細胞)(抗原感作に用い



たヒト I A P を発現する L 1 2 1 0 細胞を作製する際使用したプラスミドと同一のプラスミドを遺伝子導入し組み換え体細胞とした) を 9 6 ウェルプレートに  $1 \times 10^4$  /ウェルで播種し終夜で培養し、その後 2 % P L P (periodate-lysine-paraformaldehyde) により固定し E L I S A 用プレートを作製した。このプレートは、洗浄後 1 % B S A 溶液にて室温で 1 時間ブロッキングし、さらに洗浄後各種ハイブリドーマの培養上清を  $50 \mu\text{l}$  添加し室温で 1 時間インキュベーションした。洗浄後、アルカリフォスファターゼでラベルした抗マウス I g G + A + M (H + L) (ザイメッド社製) を添加し室温で 1 時間インキュベーションし、洗浄後 S I G M A 1 0 4 s u b s t r a t e (シグマ社製) を最終濃度  $1\text{mg/ml}$  で添加し室温でインキュベーションし、比活性をマイクロプレート・リーダー (Mode I 3550, バイオラッド社製) で測定した。

【0057】

その結果、ハイブリドーマを 2 8 8 0 ウェルに播種しその内 2 0 8 9 ウェルにハイブリドーマの出現を確認し 1 8 7 ウェルが一次スクリーニングで陽性であった。なお、陰性対照としては、マウス I g G 1 を、陽性対照としては抗ヒト C D 4 7 抗体 (ファーマンジェン社製) をそれぞれ、 $3 \mu\text{g/ml}$  濃度で  $50 \mu\text{l}$  添加し室温で 1 時間インキュベーションした。

【0058】

## ② 二次スクリーニング

一次スクリーニングで陽性と判定したクローンについて、発現ベクター p C O S 1 のみを遺伝子導入した C F - 1 細胞を対照として、ヒト I n t e g r i n A s s o c i a t e d P r o t e i n (I A P) を発現する C F - 1 細胞を用いての E L I S A 系を行うことで、ハイブリドーマが産生する抗体がヒト I A P を特異的に認識するか否かをスクリーニングした。

【0059】

その結果、一次スクリーニングで陽性と認められた 1 8 7 ウェルの内 2 1 ウェルについて陽性が認められた。これらのうち、7 D 2 および 1 1 C 8 を代表例として、ヒト I A P との特異的結合を E L I S A の吸高度で表 1 に示した。

【0060】

(表1) ハイブリドーマ培養上清のヒトIAPに対する特異的結合のELISAでの解析

=====				
<Raw data>	PBS	$\alpha$ hCD47	7D2	11C8
		3 $\mu$ g/ml		
CF1-pCOS1	0.185	0.160	0.189	0.149
CF1-hIAP-55-8	0.192	0.456	0.568	0.812
-----				
<Subtracted>	PBS	$\alpha$ hCD47	7D2	11C8
		3 $\mu$ g/ml		
-----				
Specific binding	0.007	0.296	0.379	0.663
=====				

【0061】

### ③ 三次スクリーニング

二次スクリーニングで陽性と判定したクローンについて、Jurkat細胞（ヒトT細胞リンフォーマ株）およびARH77細胞（ヒトミエローマ細胞株）を用いて増殖抑制実験を行った。Jurkat細胞は $5 \times 10^3$ /ウェルで、ARH77細胞は $1 \times 10^4$ /ウェルの細胞数で96ウェルプレートに100  $\mu$ lで播種し、この細胞の浮遊液に上記のハイブリドーマ・クローンの培養上清を5ないし10  $\mu$ l添加し、約2日間培養後MTSにより細胞数を測定した。対照としては、10%FBSを含むIMDM培地および一次スクリーニングで陰性であったクローン（8G2および9C5）の培養上清をそれぞれ5または10  $\mu$ lずつ添加した。

【0062】

その結果は、11C8、7D2-E3（7D2のサブ・クローン）、13F1、2F12の4クローンを代表例として増殖抑制効果を図5、6に示した。

【0063】

### (4) 抗体の特性

① 11C8、7D2-E3、13F1、2F12の培養上清について、イムノ

グロブリンのタイプをELISA系を用いて検討した。

【0064】

すなわち、ヒトIntegrin Associated Protein (IAP) を発現するCF-1細胞を96ウェルプレートに播種しELISAプレートを作製し上記の培養上清を50 $\mu$ l添加し、二次抗体としてはアルカリフォスファターゼでラベルした抗マウスIgG抗体（ザイメッド社製）および抗マウスIgM抗体（バイオソース社製）を反応させ、マイクロプレート・リーダーで測定した。その結果、11C8, 7D2-E3はIgGであり、13F1, 2F12はIgMであった。

【0065】

② 上記の4クローンの内11C8, 7D2-E3の2クローンについて、DNAの断片化をフローサイトメトリー（FACScan, ベクトン・ディッキンソン社製）でJurkat細胞、HL-60細胞を用い解析した。Jurkat細胞を用いては11C8および7D2-E3についてHL-60細胞を用いては11C8について検討した。

【0066】

12ウェルのプレートに、Jurkat細胞およびHL-60細胞をそれぞれ4X10<sup>4</sup>/ウェル/2mlで播種し、7D2-E3および11C8の培養上清を200 $\mu$ lを添加し2日間培養後、測定に供した。対照としては、8G2の培養上清を同等量添加した。細胞を培養プレートより回収し200xgで細胞ペレットを2mlの冷70%エタノール中に4℃で60分間固定した。次いで、細胞を遠心し、1mlのPBS中に再懸濁した。0.5 mlの細胞サンプルに対して0.5mlのRNAse (Type I-A, Sigma, St. Louis, MO, USA, 1mg/ml in PBS) を加え、次いで、1mlのヨウ化プロピジウム (PI, Sigma, 100 $\mu$ g/ml in PBS) 溶液に混合した。混合した細胞は暗所で37℃で60分間インキュベーションした後、4℃の暗所に保持し、フローサイトメトリーによる測定に供した。

【0067】

その結果、図7, 8に示す様に、7D2-E3および11C8の培養上清は、

Jurkat細胞に、11C8の培養上清はHL-60細胞に対しアポトーシスを起こしている細胞の比率を上昇させることが認められた。

【0068】

③ 上記の11C8の培養上清について、ヒト骨髓間質細胞株KM102細胞フィーダーレイヤーとしてHL-60細胞との共培養系で、これらの培養上清がHL-60細胞にアポトーシスを起こすか否かを検討した。

【0069】

すなわち、2ウェルのLab-Tek Chamber Slide (ナルジェ ヌンク インターナショナル社製) にKM102細胞を播種しsub-confluentの状態にし、この上に $1 \times 10^5$ 個のHL-60細胞を播種し約1日培養し、その後接着していないHL-60細胞を除去し同時に上記の培養上清を最終濃度で10%となるように添加し2日間培養した。培養後、細胞を10%ホルマリンで固定し、TUNEL法 (ApopTag Plus (Oncor社製)) によりアポトーシスを起こしているHL-60細胞を検出した。その結果、図9, 10に示す様に11C8の培養上清では、対照のヒトIAPと反応しないハイブリドーマクロンの培養上清9C5に比べアポトーシスになっているHL-60細胞の数は増加していることが観察された。

【0070】

#### (5) 抗体の精製

ハイブリドーマが産生する抗体の精製については、上記のハイブリドーマ株のうち、IgGを産生する7D2-E3および11C8のクローンの細胞株を、常法に従いプリスタン投与を施行したBALB/c/AnNCrjマウス(♂, 日本チャールズリバー社製)に腹腔内注入した。数週間後、産生された腹水を採取し産生される抗体を常法により分離し精製した。すなわち、得られた腹水はポロ ス プロテインA プラスチックカラム (パーセプティブ・バイオシステム社製) で精製し、PBS (ダルベッコ社製) で透析しSDS-PAGEによりバンドの確認を行った。 図11に示すごとく、標品のマウスIgG (カペル社製) を対照として電気泳動を行うと、7D2-E3および11C8のクローンのIgGは、非還元条件、還元条件ともに、標品のマウスIgGと同一の位置にバンドが

認められた。

【0071】

上記の実施例においては、感作抗原として、前記ヒト Integrin Associated Protein (IAP) を発現する L1210 細胞を使用した場合について例示したが、他のヒト IAP を発現する細胞あるいはヒト IAP そのものを使用した場合にも同様にしてモノクローナル抗体を作製すること、さらに、ファージ・ディスプレイ法を用いての抗体ライブラリーからのモノクローナル抗体の作製も可能であり、本発明は前記モノクローナル抗体に限らず、それと同様の特性を有するすべてのモノクローナル抗体、および当該モノクローナル抗体を産生するすべてのハイブリドーマを包含するものである。

【0072】

さらに、上記のモノクローナル抗体の発明には、ヒト型化抗体、ヒト抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、プライマテイズド抗体、さらに、抗体を各種酵素（パパイン、ペプシン、フィシン等）により消化した抗体の断片を含むものとする。

【0073】

本発明のモノクローナル抗体の抗ヒト Integrin Associated Protein (IAP) 抗体を産生するハイブリドーマは、DBA系マウス脾細胞とマウス・ミエローマ細胞株 P3-U1 を親細胞として作製された新規な融合細胞であり、公的微生物寄託機関である工業技術院生命工学工業技術研究所に、1997年9月11日、抗 IAP 抗体（マウスハイブリドーマ 11C8-F8（11C8のサブクローン）、MABL-1と命名した）、受託番号 FERM BP-6100、抗 IAP 抗体（マウスハイブリドーマ 7D2-E3（7D2のサブクローン）、MABL-2と命名した）、受託番号 FERM-BP-6101として国際寄託されている。

【0074】

【発明の効果】

本発明のモノクローナル抗体は、ヒト Integrin Associated Protein を特異的に認識する抗体であり、ヒト Integrin Associated Protein を有する有核血液細胞にアポトーシスを引

き起こす抗原である。従って、ヒト Integrin Associated Protein を特異的に認識する抗体として、これらを識別、同定するのに有用であると共に、有核血液細胞にアポトーシスを引き起こす作用を有することから、当該特性を利用して、骨髄性白血病およびリンパ系白血病の治療等の分野において有用な治療薬剤等として使用し得るものである。

【0075】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

GCAAGCTTAT GTGGCCCCTG GTAGCG 26

配列番号：2

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

GCGGCCGCTC AGTTATTCCT AGGAGG 26

【図面の簡単な説明】

【図1】

HL-60細胞株のmRNAより作製したcDNAからPCR法で増幅したヒトIAPのバンドを示す電気泳動写真である。左側より分子量マーカー(M)、ヒトIAP(1)、 $\beta$ アクチン(2)を示す。

【図2】

ヒトIAPを発現させたL1210細胞の抗CD47抗体によるヒトIAPの発現量を示す図である。ピークは、対照としてpCOS1のみを遺伝子導入したL1210細胞を示す。

【図3】

ヒトIAPを発現させたL1210細胞の抗CD47抗体によるヒトIAPの発現量を示す図である。ピークは、ヒトIAP遺伝子を導入したL1210細胞で明らかにヒトIAPの発現量が増加していることを示す。

【図4】

免疫マウスでの抗体価を示す図である。左側のピークは、Intact L1210細胞。右側のピークはヒトIAPを発現させたL1210細胞であり、細胞融合に供したマウスの血清は明らかにヒトIAPを認識していることを示す。

【図5】

ハイブリドーマの培養上清を用いての増殖抑制実験(Jurkat細胞)を示す図である。

【図6】

ハイブリドーマの培養上清を用いての増殖抑制実験(ARH77細胞)を示す図である。

【図7】

培養上清によるJurkat細胞に対するアポトーシス誘起作用(PI染色による解析)を示す図である。対照とした8G2の培養上清に比べ、11C8および7D2-E3は、アポトーシスの比率の増加を示す。ここで、(a)は8G2、(b)は、7D2-E3、(c)は11C8を示す。R1はアポトーシスの



比率(%)を示す。(a)では7.43%、(b)では9.84%、(c)では15.32%である。

【図8】

培養上清によるHL-60細胞に対するアポトーシス誘起作用(PI染色による解析)を示す図である。対照とした8G2の培養上清に比べ、11C8は、アポトーシスの比率の増加を示。ここで(a)は8G2、(b)は11C8を示す。M1はアポトーシスの比率(%)を示す。(a)では6.94%、(b)では12.16%である。

【図9】

KM-102とHL-60細胞との共培養系でのアポトーシスの解析(TUNEL法)であり、対照として9C5の培養上清を用いた結果を示す顕微鏡写真である。ここで、アポトーシスの細胞は黒又は褐色に染色される。核染色はメチルグリーンで行い、倍率は100倍である。

【図10】

KM-102とHL-60細胞との共培養系でのアポトーシスの解析(TUNEL法)であり、11C8の培養上清を用いた結果を示す顕微鏡写真である。TUNEL陽性細胞が図9より多数認められる。ここでアポトーシスの細胞は黒又は褐色に染色される。核染色はメチルグリーンで行い、倍率は100倍である。

【図11】

ハイブリドーマ株7D2-E3および11C8より精製されたIgGをSDS・PAGEにより解析した結果を示す電気泳動写真である。分子量マーカー(M、M')、非還元条件でのマウスIgG(標品)(1)、7D2-E3(2)、11C8(3)、還元条件でのマウスIgG(標品)(4)、7D2-E3(5)、11C8(6)を示す。

代理人弁理士 長谷川 芳樹

【書類名】

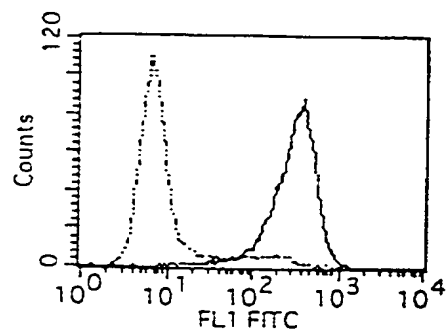
図面

【図1】

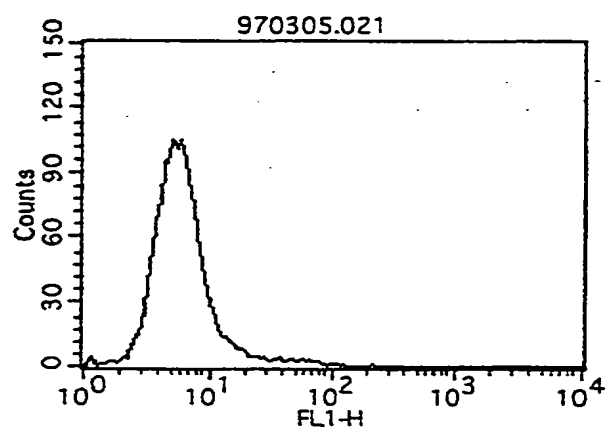
図面代用写真



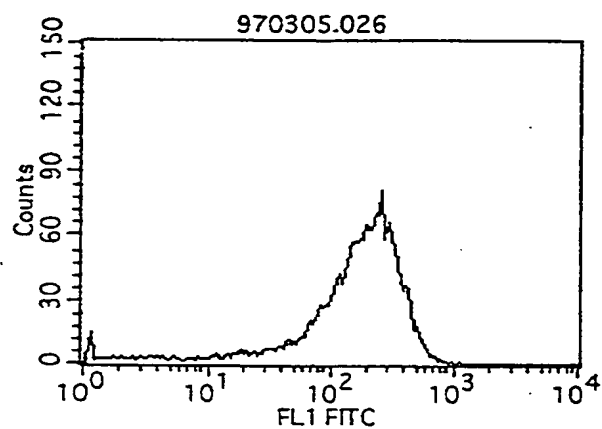
【図2】



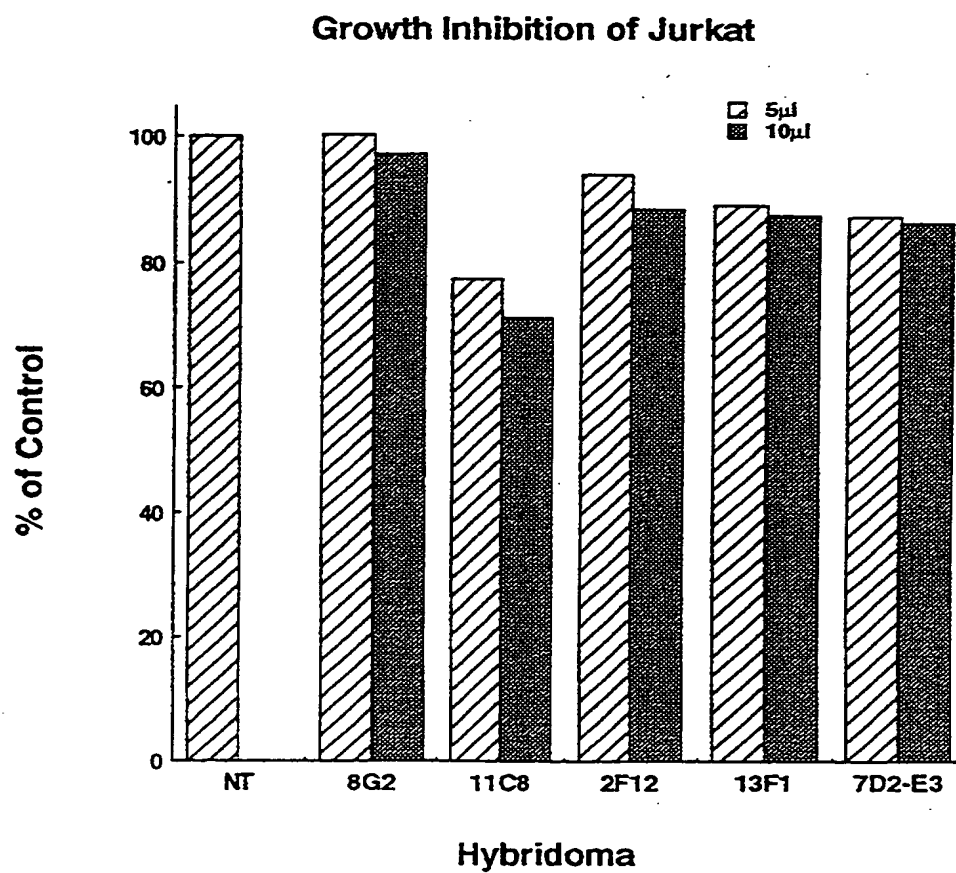
【図3】



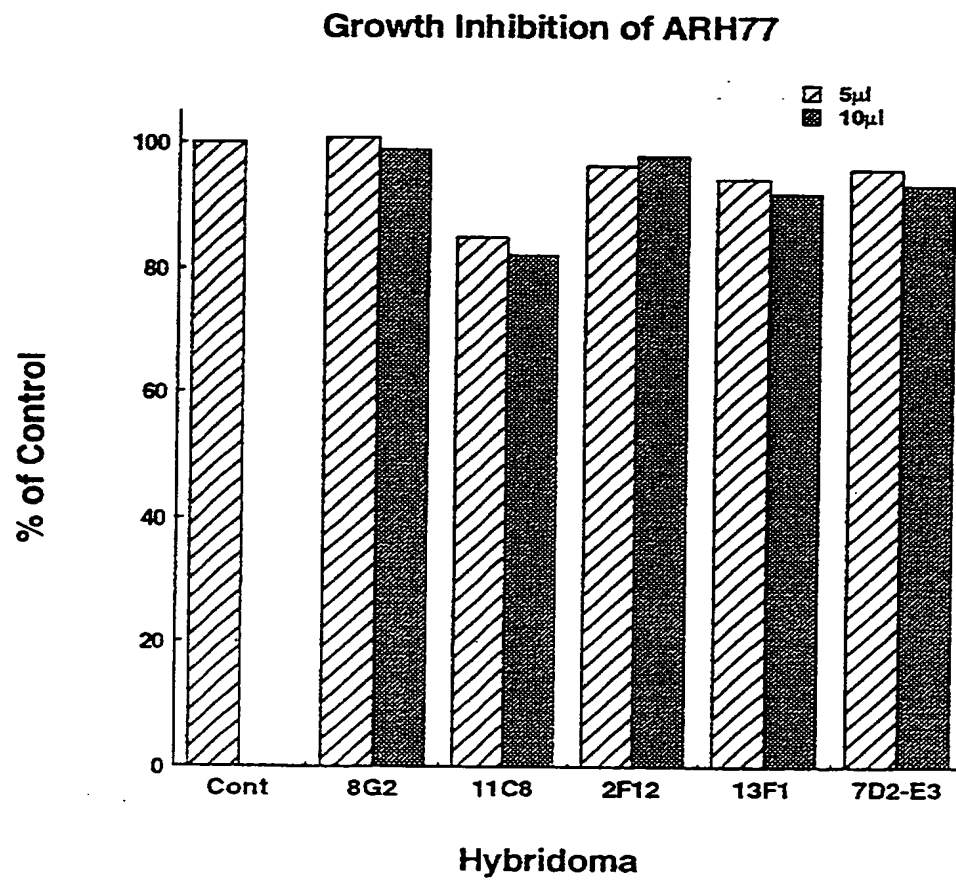
【図4】



【図5】

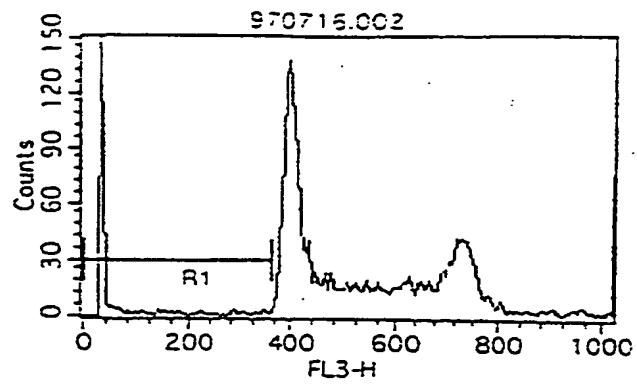


【図6】

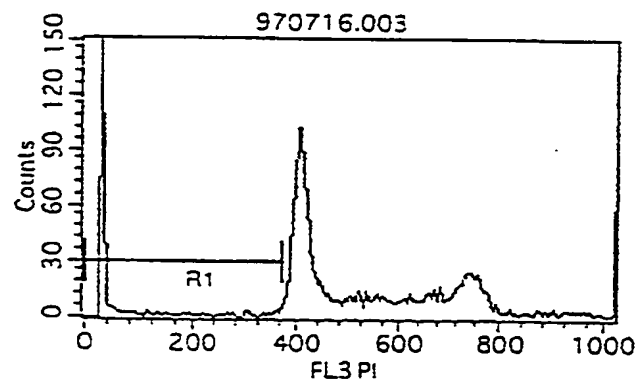


【図7】

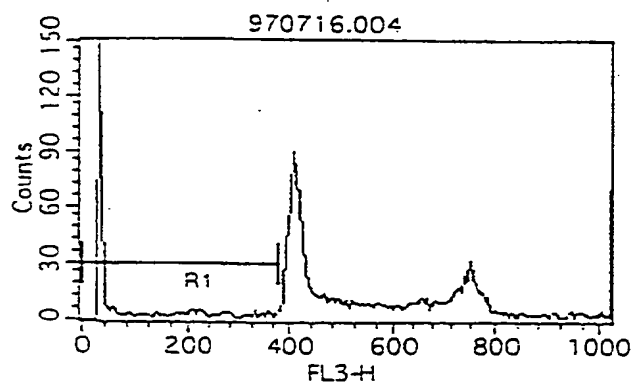
(a)



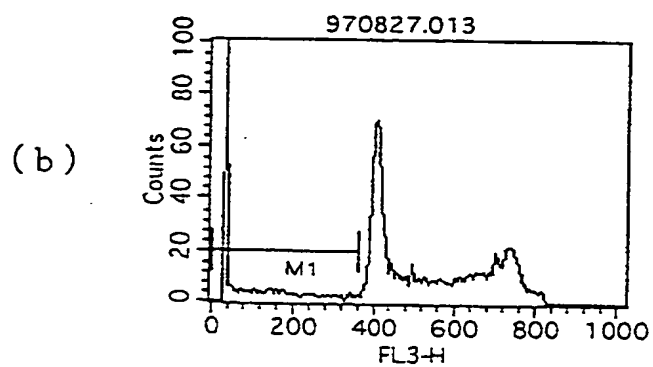
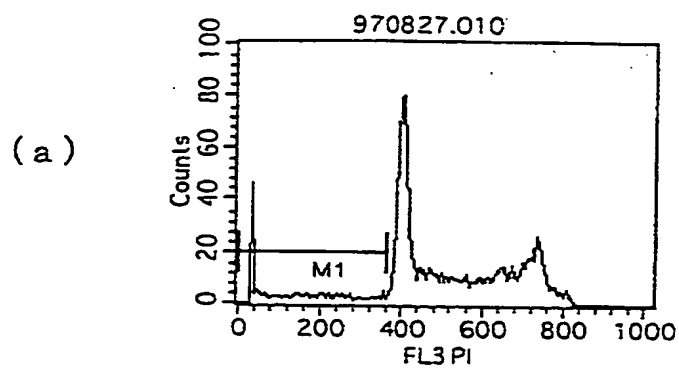
(b)



(c)

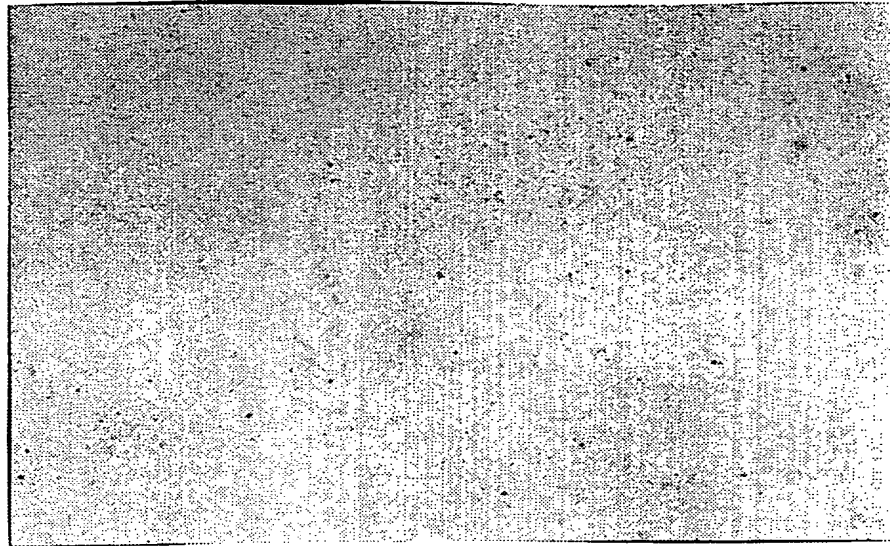


【図8】



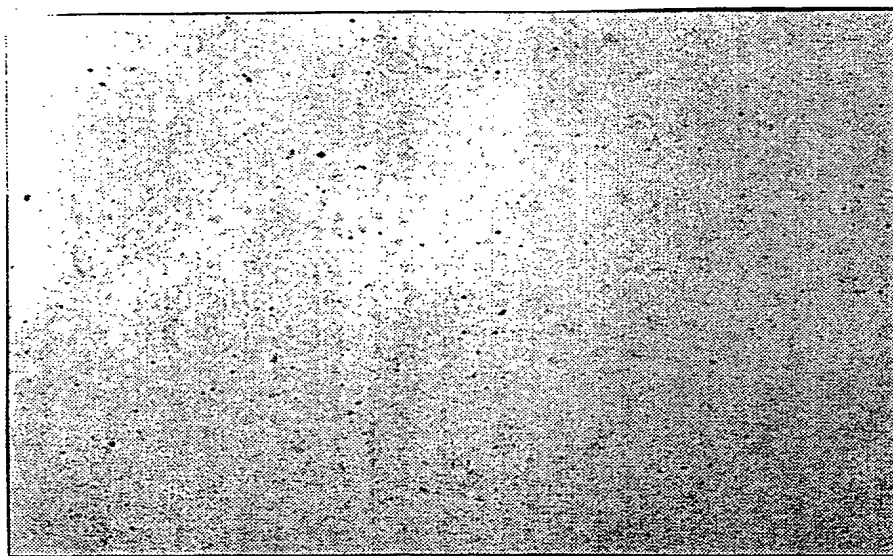
【図9】

図面代用写真



【図10】

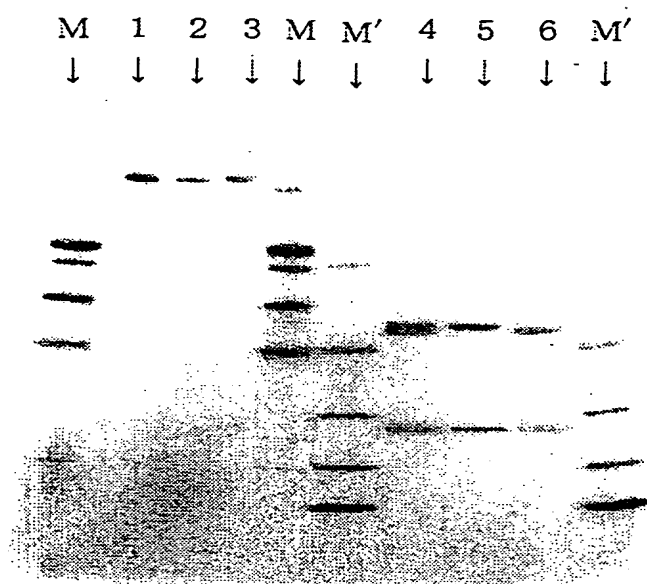
図面代用写真





【图 1 1】

图面代用写真



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 アポトーシスを誘起するモノクローナル抗体を提供する。

【解決手段】 本発明のモノクローナル抗体は、ヒトIntegrin Associated Proteinを特異的に認識する抗体であり、ヒトIntegrin Associated Proteinを有する有核血液細胞にアポトーシスを引き起こす抗原である。従って、ヒトIntegrin Associated Proteinを特異的に認識する抗体として、これらを識別、同定するのに有用であると共に、有核血液細胞にアポトーシスを引き起こす作用を有することから、当該特性を利用して、骨髄性白血病およびリンパ系白血病の治療等の分野において有用な治療薬剤等として使用し得るものである。

【選択図】 図11

国際様式 INTERNATIONAL FORM



【 特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブダペスト条約 】

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い  
発行される。

原寄託についての受託証

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIO-  
NAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF  
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF  
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL  
DEPOSIT

Issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this  
page.

氏名 (名称) 中外製薬株式会社  
取替役社長 永山 治  
寄託者 あて名 〒 115 殿  
東京都北区浮間5丁目5番1号

1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) MAB1-1 (マウスハイブリドマ)	(受託番号) FERM BP- 6100
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <input checked="" type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
3. 受領及び委託	
本国際寄託当局は、平成 9 年 9 月 11 日 (原寄託日) に受領した 1 欄の微生物を受託する。	
4. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、年 月 日 (原寄託日) に 1 欄の微生物を受領した。 そして、年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
5. 国際寄託当局	
通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 National Institute of Advanced Industrial Science and Technology Agency for Industrial Science and Technology 所長 大善 俊 Dr. Shigenori Ohsumi Director-General あて名: 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305) 1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305. JAPAN 平成 9 年 (1997) 9 月 11 日	

国際様式 INTERNATIONAL FORM



特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブタベスト条約

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い  
発行される。

原寄託についての受託証

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF  
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF  
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL  
DEPOSIT

Issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this  
page.

氏名 (名称) 中外製薬株式会社  
取締役社長 永山 治  
寄託者 あて名 〒 115  
東京都北区浮間5丁目5番1号

1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) MABL-2 (マウスハイブリドーマ)	(受託番号) FERM BP- 6101
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <input type="checkbox"/> 科学的性質 <input type="checkbox"/> 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成 9 年 9 月 11 日 (原寄託日) に受領した1欄の微生物を受託する。	
4. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、 年 月 日 (原寄託日) に1欄の微生物を受領した。 そして、 年 月 日 に原寄託よりブタベスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
5. 国際寄託当局	
通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 名称: National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency for Chemical Science and Technology 所長 大曾 信 Dr. Shin'ichi Ohsuga Director-General あて名: 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号 (郵便番号305) 1-3, Higashi 1-chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305, JAPAN 平成 9 年 (1997) 9 月 11 日	

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000003311  
【住所又は居所】 東京都北区浮間5丁目5番1号  
【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100088155  
【住所又は居所】 東京都中央区京橋二丁目13番10号 京橋ナショナルビル6階 創英国際特許事務所  
【氏名又は名称】 長谷川 芳樹

【選任した代理人】

【識別番号】 100089978  
【住所又は居所】 東京都中央区京橋二丁目13番10号 京橋ナショナルビル6階 創英国際特許事務所  
【氏名又は名称】 塩田 辰也

【選任した代理人】

【識別番号】 100092657  
【住所又は居所】 東京都中央区京橋二丁目13番10号 京橋ナショナルビル6階 創英国際特許事務所  
【氏名又は名称】 寺崎 史朗

【選任した代理人】

【識別番号】 100094318  
【住所又は居所】 東京都中央区京橋二丁目13番10号 京橋ナショナルビル6階 創英国際特許事務所  
【氏名又は名称】 山田 行一

【選任した代理人】

【識別番号】 100089901  
【住所又は居所】 東京都中央区京橋二丁目13番10号 京橋ナショナルビル6階 創英国際特許事務所  
【氏名又は名称】 吉井 一男

【選任した代理人】

【識別番号】 100107191  
【住所又は居所】 東京都中央区京橋二丁目13番10号 京橋ナショナルビル6階 創英国際特許事務所  
【氏名又は名称】 長濱 範明

特平 9 - 2 6 4 8 5 3

【提出された物件の記事】

【提出物件名】 原寄託についての受託証 2

【書類名】 手続補正書

【提出日】 平成 9年10月23日

【あて先】 特許庁長官殿

【事件の表示】

【出願番号】 平成 9年特許願第264853号

【補正をする者】

【事件との関係】 特許出願人

【識別番号】 000003311

【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100088155

【弁理士】

【氏名又は名称】 長谷川 芳樹

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許願

【補正対象項目名】 提出物件の目録

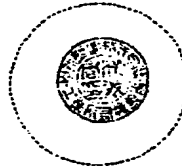
【補正方法】 追加

【補正の内容】

【提出物件の目録】

【物件名】 代理権を証明する書面 1

29720300244



## 委任状

私は弁理士 長谷川芳樹、同塩田辰也、同寺崎史朗、同山田行一、  
同吉井一男、同佐藤英二、同沖本一暁、同長濱範明、同池田成人、  
同近藤伊知良、同國分敦を代理人と定めて下記事項を委任する。

- 1、 特許出願に関する一切の件
- 2、 上記事件につき、出願の変更並びにこれらの出願の結果につき補  
正の却下の決定及び拒絶査定に対する審判を請求し、必要がある場合  
にはこれら出願又は請求の取下げ並びに放棄に関する事項を処理する  
の件
- 3、 復代理人を選任及び解任するの件
- 4、 上記出願又は 年 願 号

に基づく特許法第41条第1項及び実用新案法第8条第1項の優先権  
主張並びにその取下げ。

平成 9 年 9 月 5 日

名 称 東京都北区浮間5丁目5番1号  
中外製薬株式会社  
代表者 取締役社長 永山 治



印



【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 手続補正書

<認定情報・付加情報>

【補正をする者】

【識別番号】 000003311

【住所又は居所】 東京都北区浮間5丁目5番1号

【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100088155

【住所又は居所】 東京都中央区京橋二丁目13番10号 京橋ナショナルビル6階 創英国際特許事務所

【氏名又は名称】 長谷川 芳樹

【提出された物件の記事】

【提出物件名】 委任状（代理権を証明する書面） 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000003311]

1. 変更年月日	1990年 9月 5日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都北区浮間5丁目5番1号
氏 名	中外製薬株式会社